

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: **Hideshi FUJIWAKE**

Serial No.: **Not Yet Assigned**

Filed: **December 17, 2001**

For: **AMINO ACID SEQUENCE DETERMINATION FOR PROTEIN OR THE LIKE**



#2  
ML

**CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

December 17, 2001

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign applications are hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

**Japanese Appln. No. 2000-402767, filed December 28, 2000**

In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of these applications be marked to indicate that the applicant has complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,  
ARMSTRONG, WESTERMAN, HATTORI  
MCLELAND & NAUGHTON, LLP

Donald W. Hanson  
Reg. No. 27,133

Atty. Docket No.: 011658  
Suite 1000, 1725 K Street, N.W.  
Washington, D.C. 20006  
Tel: (202) 659-2930  
Fax: (202) 887-0357  
DWH/II

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年12月28日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-402767

出 願 人

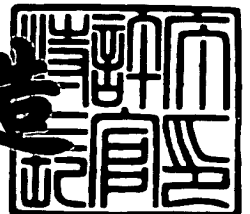
Applicant(s):

株式会社島津製作所

2001年 9月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3085533

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1000832

【提出日】 平成12年12月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/52

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津  
製作所内

【氏名】 藤分 秀司

【特許出願人】

【識別番号】 000001993

【氏名又は名称】 株式会社島津製作所

【代理人】

【識別番号】 100085464

【弁理士】

【氏名又は名称】 野口 繁雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 037017

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9110906

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質等のアミノ酸配列決定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の工程 (A) 及び (B) を含むことを特徴とするタンパク質又はペプチドのアミノ酸配列決定方法。

(A) タンパク質又はペプチドの N 末端から構成アミノ酸を逐一に化学的に切断し、構成アミノ酸を遊離させる工程、及び

(B) 上記化学的切断で遊離した構成アミノ酸の誘導体に対する抗体を利用したイムノアッセイ法で遊離アミノ酸を同定する工程。

【請求項 2】 以下の工程 (A) 及び (B) を含むことを特徴とするタンパク質又はペプチドのアミノ酸配列決定方法。

(A) タンパク質又はペプチドの N 末端から構成アミノ酸を逐一に化学的に切断し、構成アミノ酸を遊離させる工程、及び

(B) 上記化学的切断で遊離した構成修飾アミノ酸の誘導体に対する抗体を利用したイムノアッセイ法で遊離アミノ酸を同定する工程。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はタンパク質又はペプチドのアミノ酸配列を決定する分野に関する。

【0002】

【従来技術】

タンパク質やペプチドを N 末端側から逐一に化学的に切断 (EDMAN 分解) し、構成アミノ酸を決定する方法は 1950 年代に確立され、現在でも広く利用されている。現在実用化されている技術は EDMAN 分解後、遊離する構成アミノ酸を分析しやすい誘導体である PTH アミノ酸 (3-フェニル-2-チオヒダントン誘導体) として高速液体クロマトグラフィーで同定する方法である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

現在実用化されている上記の方法には下記の問題がある。

## 1) 検出感度:

UV (紫外線) 検出型の高速液体クロマトグラフィーではPTHアミノ酸の検出感度として、1 pmolから100 fmol (PTHアミノ酸として) が限界である。この問題を解決すべく、誘導体を蛍光性アミノ酸誘導体として蛍光検出を利用する方法や、検出手段としてマスマススペクトロメトリーを利用する方法などが提案され研究されているが、いずれも実用化されていない。

## 【0004】

## 2) 構成アミノ酸が糖鎖などで修飾された場合の同定:

現存のUV検出型の高速液体クロマトグラフィーを利用する方法では、遊離した構成アミノ酸は、高速液体クロマトグラフのリテンション時間から同定する。しかし、構成アミノ酸が糖鎖やリン酸化により修飾されている場合は、リテンション時間が非修飾の場合と異なり、リテンション時間から構成アミノ酸の同定や修飾の種類を決定することは不可能である。

## 【0005】

また、仮に標準品として各種の修飾PTHアミノ酸 (例えば、リン酸化PTHチロシンなど) が準備できたとしても、現状の高速液体クロマトグラフィーを利用する方法ではそれぞれのリテンション時間が異なるように高速液体クロマトグラフィーの分析条件を設定する必要があるが、各種の修飾PTHアミノ酸が多数に渡ることから、これは実際上不可能である。

## 【0006】

高速液体クロマトグラフィー/マスマススペクトロメトリー (高速液体クロマトグラフィーで分離された各成分をマスマススペクトロメトリーで更に分析し、分子量の情報も取得する分析法) を利用すれば、分子量の情報が加味されるので、高速液体クロマトグラフィー単独で行なう分析に比べ、この修飾の問題では有利ではあるが、1) で述べたように感度が十分でないという問題がある。

## 【0007】

そこで、本発明の第1の目的は、遊離された構成アミノ酸を従来の方法よりも高感度に検出できるようにすることである。

本発明の第2の目的は、遊離された構成アミノ酸が修飾されたものであっても

、高感度に検出できるようにすることである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の工程（Ａ）及び（Ｂ）を含むタンパク質又はペプチドのアミノ酸配列決定方法である。

（Ａ）タンパク質又はペプチドのＮ末端から構成アミノ酸を逐一に化学的に切断し、構成アミノ酸を遊離させる工程、及び

（Ｂ）上記化学的切断で遊離した構成アミノ酸又は構成修飾アミノ酸の誘導体に対する抗体を利用したイムノアッセイ（免疫測定）法で遊離アミノ酸を同定する工程。

【0009】

本発明では、EDMAN分解で遊離する各種PTHアミノ酸（修飾PTHアミノ酸も含む）に対するモノクローナル抗体を利用するイムノアッセイ法で上記各種PTHアミノ酸を同定する。イムノアッセイ法としては、発明の実施の形態で説明する「競合法」の他、各種のイムノアッセイ法を利用することができる。

【0010】

また、モノクローナル抗体の作成法に関しては従来から使用されてきた各種PTHアミノ酸をマウスなどに免疫し、モノクローナル抗体を得る方法以外に、「ファージディスプレイ」などの分子生物学的手法も利用できる。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明方法の手順を示すと、次のようになる。

（ステップ１）：EDMAN分解

現在実用化されているEDMAN分解装置をそのまま利用してEDMAN分解を行ない、PTHアミノ酸誘導体を得る。

【0012】

（ステップ２）：

ステップ１で得られたPTHアミノ酸誘導体に対して、イムノアッセイ法（ここでは一例として競合法を用いる。）を行なう。そのイムノアッセイ法について

説明する。

【 0 0 1 3 】

図 1 (A) はそのイムノアッセイ法に用いるマイクロプレート 2 であり、各ウエル 2 a 内には各種 PTH アミノ酸に対するモノクローナル抗体が 1 種類固定化されている。また、各ウエル 2 a にはそれぞれのモノクローナル抗体 4 と結合する PTH アミノ酸誘導体のアナログ (類縁化合物) で、標識 8 がついた PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 の一定量が予め添加されて、モノクローナル抗体 4 と結合している (図 1 (B) の右端部分参照)。

【 0 0 1 4 】

ステップ 1 で得られた PTH アミノ酸誘導体を含む溶液をマイクロプレート 2 に滴下すると、図 1 (B) に示されるように、その PTH アミノ酸誘導体 1 0 と反応するモノクローナル抗体 4 が固定化されているウエル 2 a では、モノクローナル抗体 4 との結合反応が PTH アミノ酸誘導体 1 0 と標識がついた PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 との間で競合する。

【 0 0 1 5 】

ついで、非結合の PTH アミノ酸誘導体 1 0 と標識がついた PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 を洗い流すと、図 1 (C) に示されるように、モノクローナル抗体 4 と結合した PTH アミノ酸誘導体 1 0 と標識がついた PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 が残る。

【 0 0 1 6 】

次に、PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 に対する抗体 1 2 を加えると、図 1 (D) に示されるように、PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 の標識 8 に抗体 1 2 が結合する。抗体 1 2 には標識 1 4 として例えば酵素が結合させられている。その後、非結合の抗体 1 2 を洗い流す。

その後、酵素標識された抗体 1 2 の量を調べることで、標識がついた PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 の量を調べる。

【 0 0 1 7 】

このイムノアッセイ法では、各ウエル 2 a 中の PTH アミノ酸に対するモノクローナル抗体 4 の量は一定であり、この抗体 4 に対し、PTH アミノ酸誘導体 1

0と標識がついたPTHアミノ酸誘導体のアナログ6が競合的に結合する。標識がついたPTHアミノ酸誘導体のアナログ6も一定量にすれば、PTHアミノ酸誘導体10の量が多くなるほど、結合する標識がついたPTHアミノ酸誘導体のアナログ6の量が減少し、最終的な酵素標識された抗体12の量も減ることになる。この原理でPTHアミノ酸誘導体10の種類と量が決定できる。

## 【0018】

なお、上記説明はイムノアッセイ法として競合法を用いた場合について説明を行なったが、他のイムノアッセイ法も利用できる。

また、抗体と結合したPTHアミノ酸の検出方法として、蛍光偏光解消法などを利用すれば、上記説明で必須であった洗浄工程などが割愛でき、工程を簡略化できる。

## 【0019】

本発明方法全体の工程の流れは以下になる。

[N末端からEDMAN分解] → [イムノアッセイ法による最初のN末端アミノ酸の同定] → [次のEDMAN分解] → [イムノアッセイ法による2番目のN末端アミノ酸の同定] → 以下、繰り返す。

また、説明はマイクロプレートに関して行なったが、微細領域に抗体を固定化すれば、チップ化も容易に行なえる。

## 【0020】

## 【発明の効果】

本発明は、(A) タンパク質又はペプチドのN末端から構成アミノ酸を逐一に化学的に切断し、構成アミノ酸を遊離させる工程、及び(B) 上記化学的切断で遊離した構成アミノ酸又は構成修飾アミノ酸の誘導体に対する抗体を利用したイムノアッセイ法で遊離アミノ酸を同定する工程を含んでタンパク質又はペプチドのアミノ酸配列を決定するようにした。このように、遊離させた構成アミノ酸の検出にイムノアッセイ法を使用したのもので、検出感度としては、attomol, zmolのオーダーの検出が容易になる。

また、構成アミノ酸が糖鎖などで修飾されている場合に対しても、対応するモノクローナル抗体を用意すれば、簡単に拡張できる。



【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明で使用するイムノアッセイ法を説明する図である。

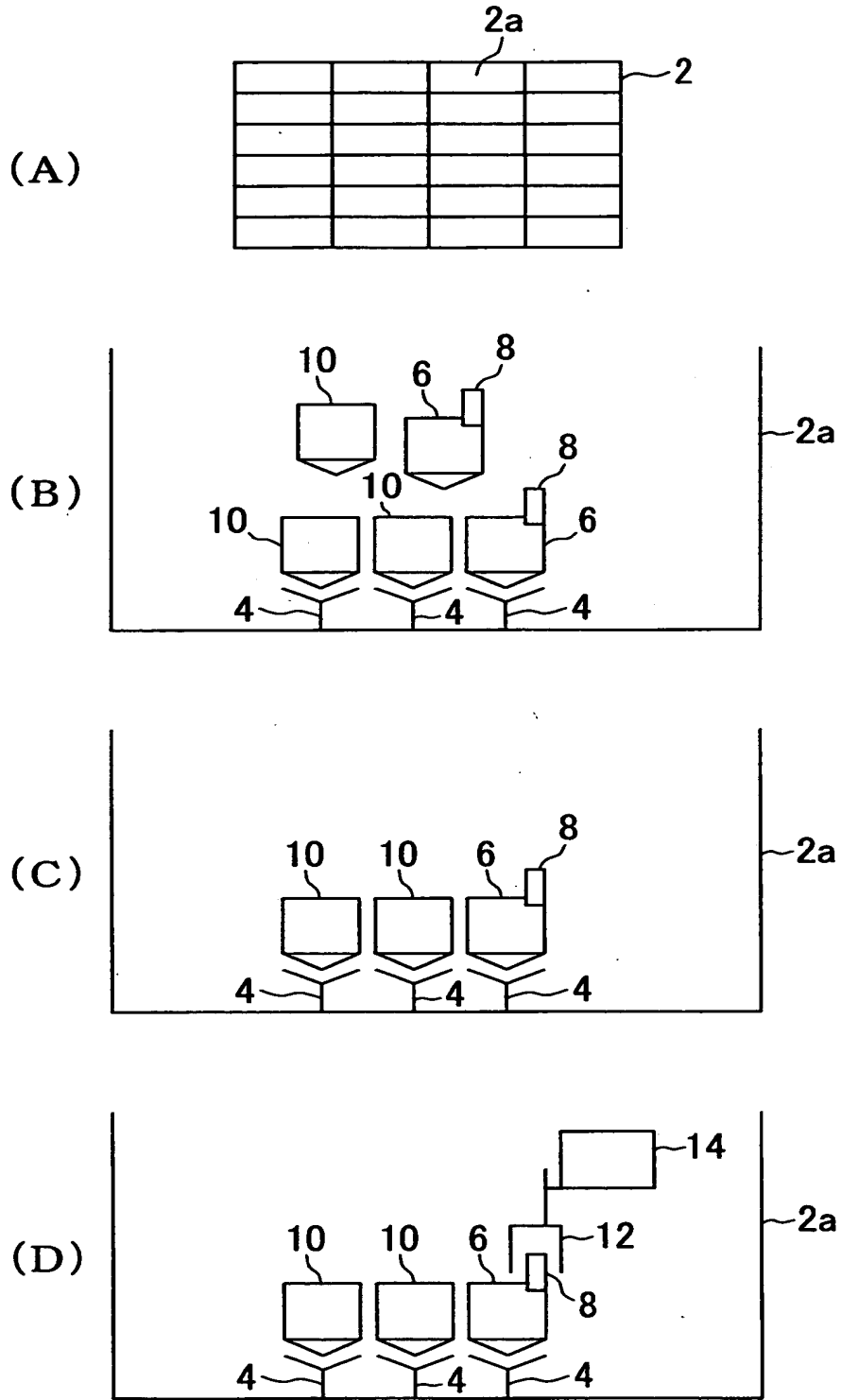
【符号の説明】

- 2 a      ウエル
- 4          ウエルに固定されたモノクローナル抗体
- 6          PTHアミノ酸誘導体のアナログ
- 8          PTHアミノ酸誘導体のアナログの標識
- 1 0        PTHアミノ酸誘導体
- 1 2        PTHアミノ酸誘導体のアナログに対する抗体
- 1 4        抗体の標識

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遊離された構成アミノ酸を高感度に検出する。

【解決手段】 マイクロプレート 2 の各ウエル 2 a 内にそれぞれのモノクローナル抗体を 1 種類固定化しておき、標識 8 がついた PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 を結合させておく。EDMAN 分解により得られた PTH アミノ酸誘導体 1 0 を含む溶液をマイクロプレート 2 に滴下してモノクローナル抗体 4 との結合反応を PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 との間で競合させ、非結合の PTH アミノ酸誘導体 1 0 と PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 を洗い流した後、PTH アミノ酸誘導体のアナログ 6 に対する酵素標識された抗体 1 2 を加え、抗体 1 2 の量を調べることで、PTH アミノ酸誘導体 1 0 の種類と量を決定する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001993]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

氏 名 株式会社島津製作所